Određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnim žlijezdama dagnji Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819. uzrokovanih u sjevernom Jadranu

Štefanko, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:700106

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

KARLA ŠTEFANKO

ODREĐIVANJE STABILNOSTI LIZOSOMALNIH MEMBRANA U PROBAVNIM ŽLIJEZDAMA DAGNJI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819. UZORKOVANIH U SJEVERNOM JADRANU

ZAVRŠNI RAD

Pula, 2018.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

KARLA ŠTEFANKO

ODREĐIVANJE STABILNOSTI LIZOSOMALNIH MEMBRANA U PROBAVNIM ŽLIJEZDAMA DAGNJI *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK, 1819. UZORKOVANIH U SJEVERNOM JADRANU

Završni rad

JMBAG: 0303060952, redoviti student

Studijski smjer: Znanost o moru

Predmet: Biološki učinci zagađivala

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarno

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: doc. dr. sc. Ines Kovačić

Pula, 2018.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Karla Štefanko, kandidatkinja za prvostupnicu Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Karla Štefanko

_____

U Puli, 5. rujna 2018. godine

IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Karla Štefanko dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom " Određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819. uzorkovanih u sjevernom Jadranu " koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu sa Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 5. rujna 2018. godine

Potpis

_____

ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Ines Kovačić na danim savjetima i smjernicama koje su mi pomogle prilikom izrade ovog završnog rada, te njezinom strpljenju i vremenu koje mi je posvetila.

Zahvaljujem se prof. dr. sc Nevenki Bihari na mogućnosti izrade završnog rada u Laboratoriju za morsku ekotoksikologiju, Instituta Ruđer Bošković, Centra za istraživanje mora u Rovinju.

Zahvaljujem se svojoj obitelji koja je uvijek uz mene, te mi je uvijek davala veliku podršku tijekom mog cjelokupnog školovanja, u lijepim i u teškim trenucima.

Također, zahvaljujem se i svim profesorima koji su doprinijeli temeljima i nadogradnji mog znanja iz biologije, koja su mi pomogla ne samo u izradi ovog završnog rada nego i tijekom cijelog školovanja.

Sadržaj

1 Uvod 1

1. 1 Mediteranska dagnja - *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) 1

1.1.1 Rasprostranjenost 2

1.1.2 Anatomija i fiziologija dagnje 3

1.1.3 Bioindikatorski organizam 3

1.2 Histološke analize probavne žlijezde 4

1.3 Lizosomi 4

1.3.1 Oštećenje lizosoma u dagnjama *Mytilus galloprovincialis* 5

1.4 Onečišćenje okoliša 6

1.4.1 Utjecaj metala 6

1.4.2 Utjecaj eutrofikacije 7

2 Cilj istraživanja 9

3 Materijali i metode 10

3.2 Uzorkovanje školjkaša 11

3.3 Izolacija i priprema tkiva 11

3.4 Određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana 12

3.5 Prikaz i statistička obrada rezultata 14

4 Rezultati 16

4.1 Karakterizacija postaja 16

4.1.1 Trofički indeks na postajama sjevernog Jadrana 16

4.1.2 Koncentracije teških metala na postajama sjevernog Jadrana 17

4.2 Stabilnost lizosomalnih membrana 17

5 Rasprava 20

6 Zaključak 22

7 Literatura 23

7.1 Knjige, znanstveni i stručni radovi 23

7.2 Internetski izvori 28

8 Popis slika 29

9 Sažetak 30

10 Abstract 31

1 UVOD

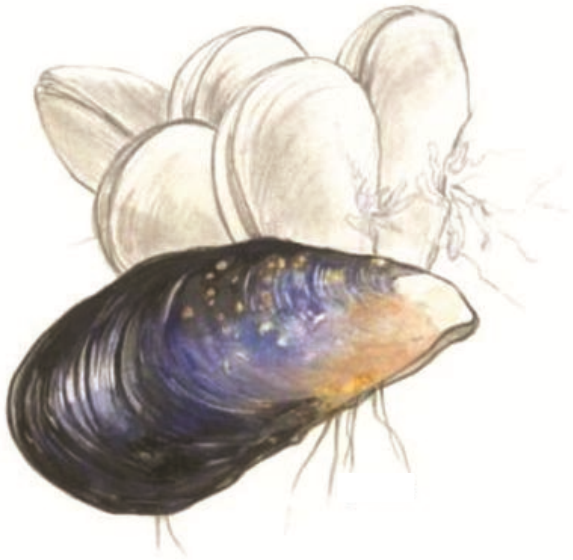
1. 1 Mediteranska dagnja - *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

vrsta: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

porodica: Mytilidae

red: Mytiloida

koljeno: Mollusca



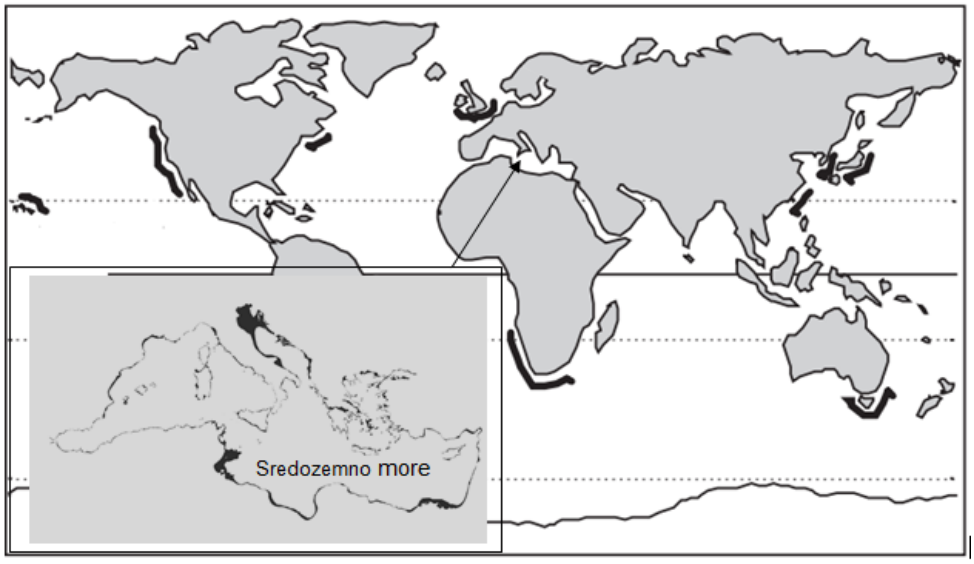
Slika 1. Mediteranska dagnja – *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). (izvor: http://wwfsassi.co.za/)

Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) je školjkaš tamnoplave do crne boje. Građena je od dvije trokutaste ljušture jednolikog oblika koje mogu biti prekrivene različitim obraštajima, te se jakim bisusnim nitima pričvršćuje za podlogu (Slika 1.). Filtratorski je organizam i može filtrirati oko 80 L morske vode dnevno u optimalnim uvjetima (temperatura vode, dostupnost hrane, reproduktivni ciklus), putem kojeg unosi čestice hrane, partikularnu tvar i koloidne čestice. Dagnje žive u širokom rasponu saliniteta i temperature, te imaju visoku toleranciju na kolebanje abiotičkih i biotičkih čimbenika (Franzellitti i sur., 2010). Mediteranska dagnja ima obilježja snažnog kompetitora kao što je brzi rast duž velikog raspona temperature vode (Griffiths i sur., 1992), otpornost na isušivanje

(Hockey i van Erkom Schurink, 1992) i veliki reproduktivni kapacitet, te se u mnogim morima i oceanima pojavljuje kao invazivna vrsta.

1.1.1 Rasprostranjenost

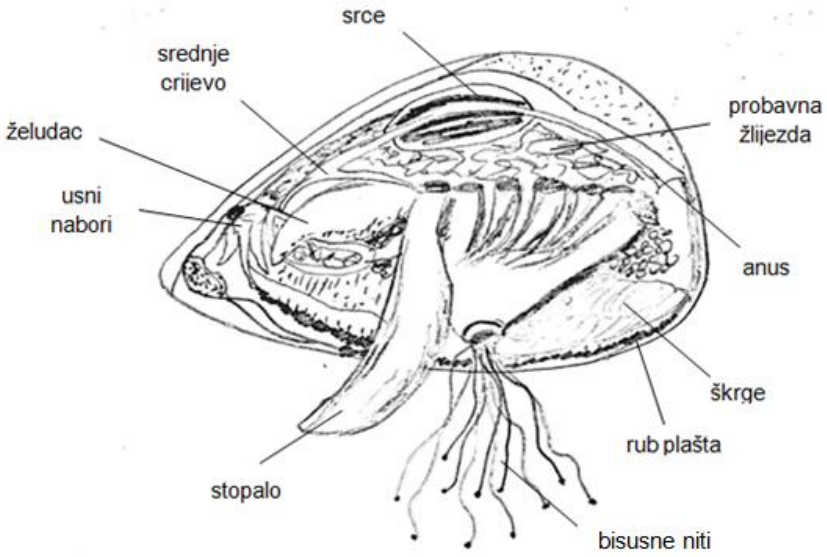
Mediteranska dagnja je zbog dugog životnog vijeka svojih planktonskih ličinki široko rasprostranjena (Štambuk i sur., 2013). Sesilni je organizam i naseljava obalna područja i estuarijske stjenovite obale u zoni plime i oseke gdje su stalno prisutne hidrodinamičke promjene koje uzrokuju valovi (Gaylord i sur., 1994). Život dagnje je ograničen na zonu plime i oseke zbog bioloških faktora kompeticije i predacije, ali i teških uvjeta koji vladaju u dubljim slojevima infralitoralne zone u kojima njezin život nebi bio moguć (Gosling, 1992). Mediteranska dagnja je autohtona vrsta u Mediteranskom, Crnom i Jadranskom moru, ali naseljava i atlantsku obalu Francuske, Nizozemske sve do sjeverne Irske (Teskeredžić i sur., 2004). Putem balastnih voda i obraštajem brodova proširila se na obale Hong Konga (Lee i Morton, 1985), Japana (Wilkins i sur., 1983), Kine, Koreje (McDonald i sur., 1990), jugoistočne Australije, Hawaii-a, Meksika, južne Kalifornije (McDonald i Koehn, 1988), Washingtona, zapadne obale Kanade i južne Afrike (Branch i Steffani, 2004; Slika 2.). U Jadranskom moru, najgušće je naseljena u Novigradskom i Karinskom moru, Šibenskom zaljevu i kanalu, Limskom kanalu, Malostonskom i Pulskom zaljevu (Župan i Šarić, 2014).



Slika 2. Područja rasprostranjenosti vrste *Mytilus galloprovincialis* u svijetu i Sredozemnom moru. (izvor: http://freegisdata.org/; Branch i Steffani, 2004)

1.1.2 Anatomija i fiziologija dagnje

Ispod ljušture školjkaša nalazi se plašt, koji obavija cijelo tijelo (Slika 3.). Ljušture su proizvodi plašta i spojene su elastičnim ligamentom. Ispod plašta nalazi se viscelarna masa i škrge. Viscelarnu masu čine srce, probavni sustav i gonade. Pomoću škrga školjkaši filtriraju morsku vodu, osim što im omogućuju disanje, škrge sudjeluju i u procesu hranjenja. Probavni sustav sastoji se od usnog nabora, jednjaka, želudca, probavne žlijezde i anusa. Kod školjkaša, a tako i kod dagnje postoji izvanstanična i unutarstanična probava. Izvanstanična probava odvija se u želudcu i crijevima, a veliku ulogu u unutarstaničnoj probavi ima probavna žlijezda čije su stanice bogate lizosomima (Owen, 1972). Stopalo sadrži mnogobrojne žlijezde koje izlučuju sluz, a nakon izlaska iz žlijezda sluz se stvrdne u čvrsta i dugačka vlakna, koja se nazivaju bisusi, te se uz pomoć njih dagnje pričvršćuju za podlogu (Matoničkin i sur., 1998). Dagnje posjeduju parne gonade i odvojenog su spola. Spolno zreli mužjaci imaju gonade mliječno bijele ili krem boje, dok su gonade ženke najčešće narančasto crvenkaste boje (Župan i Šarić, 2014).



Slika 3. Shematski prikaz anatomije dagnje *Mytilus galloprovincialis*.

1.1.3 Bioindikatorski organizam

Dagnja *Mytilus galloprovincialis* je jedan od najupotrebljivanijih bioindikatorskih organizama (Jakšić i sur., 2005) zbog široke rasprostranjenosti, lakog uzorkovanja,

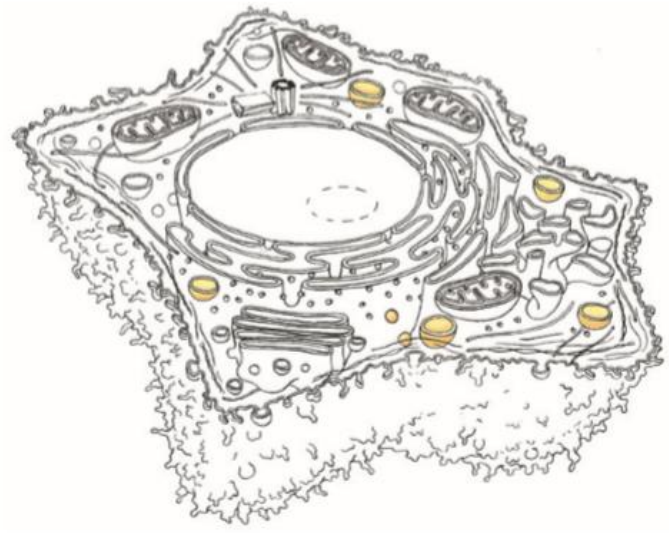
dobre prilagodbe na laboratorijske uvjete, sedentarnosti i sposobnosti filtracije morske vode. Ujedno, ove osobine ih čine dobrim bioindikatroskim organizmima koji se koriste u procjeni stanja okoliša (Alam i sur., 1999). Filtriranjem unose hranjive tvari, ali s time unose i onečišćivala koja se akumuliraju u njihovom organizmu. Dagnje se koriste u raznim fizikalno-kemijskim, biološkim i genetičkim istraživanjima, te su osjetljive na tragove teških metala i organske tvari (Domouhtsidou i sur., 2004). Osim toga, relativno su tolerantne na mnoge metale i organske ksenobiotike, ali bez obzira na to pokazuju različite patološke reakcije i na minimalne koncentracije onečišćivala. Aktivnost enzima koji sudjeluju u biotransformacijama organskih spojeva u dagnjama je izuzetno niska i zbog toga se većina tih tvari ne metabolizira, već se akumulira u organizmu. Uočavanjem promjena u organizmu, bilo na molekularnoj ili staničnoj razini ukazuje na prisutnost onečišćenja okoliša i zagađenja.

1.2 Histološke analize probavne žlijezde

Uz pomoć histoloških analiza otkrivaju se različite degenerativne (vakuolizacija, atrofija), destruktivne (nekroza, smanjenje epitelnog sloja) i upalne patološke promjene koje služe za procjenu morfološkog i funkcionalnog stanja probavnih žlijezdi školjkaša (Usheva i sur., 2006). Jedan od najčešćih patoloških promjena u stanicama probavnih žlijezdi je povećana vakuolizacija stanica, te se pojavljuje u školjkašima koji su pod utjecajem anorganskih i organskih onečišćujućih tvari (Usheva i sur., 2006).

1.3 Lizosomi

Lizosomi su citoplazmatski organeli, okruženi jednostrukom membranom i sadrže više od 50 različitih vrsta histolitičkih enzima koji su aktivni pri kiselom pH (Slika 4.). Naziv potječe od grčke riječi *lysis*, što znači raspad ili uništavanje, te *soma*, što znači tijelo. Lizosomi djeluju kao probavni sustav stanice koji razgrađuje tvari unesene u stanicu i dotrajale dijelove stanice. Sposobni su razgraditi sve biološki važne molekule, kao što su proteini, nukleinske kiseline, ugljikohidrati i lipidi. Najbrojniji su u stanicama koji obavljaju funkciju probave i razgradnje tvari, kao što su jetra, gušterača, bubrezi, slezena i stanice imunološkog sustava. Nalaze se u stanicama svih životinja, ali i nekih vrsta biljaka.



Slika 4. Shematski prikaz lizosoma unutar stanice (Cooper Hausman, 2004).

Lizosomi nastaju stapanjem transportne vezikule koje nose kisele hidrolize iz Golgijevog aparata s kasnim endosomima, a kasni endosom nastaje dozrijevanjem ranog endosoma koji se formirao stapanjem endocitoznih vezikula s ranim endosomom.

1.3.1 Oštećenje lizosoma u dagnjama *Mytilus galloprovincialis*

Lizosomi u epitelnim stanicama probavne žlijezde školjkaša djeluju kao središnje mjesto za sekvestraciju i akumulaciju toksičnih metala i organskih onečišćujućih tvari, ali imaju i značajnu funkciju u procesima detoksikacije i daljnjem izlučivanju tih spojeva (Petrović i sur., 2001). Lizosomi su iznimno osjetljivi na minimalne koncentracije onečišćivala koji prodiru u stanicu (Martínez-Gómez i sur., 2015). Onečišćujuće tvari mogu dovesti do promjene veličine i broja lizosoma, promjene permeabilnosti membrane i osmotskog poremećaja (Aarab i sur., 2008). Izloženost dagnje *M. galloprovincialis* takvim tvarima, pokazuje karakteristične fiziološke ili patološke promjene koje dovode do smanjenja integriteta lizosomalnih membrana (Moore i sur., 1988). Karakteristične patološke promjene za lizosome izložene onečišćivalima su oticanje lizosoma u probavnim stanicama, povećana lomljivost lizosomalne membrane, prekomjerno nakupljanje nezasićenih neutralnih lipida u lizosomalnom odjeljku i nakupljanje lipofuscina. Destabilizacija lizosomalnih membrana može rezultirati ispuštanjem hidrolitičkih enzima u citosol, što može dovesti do ozbiljnog oštećenja staničnih komponenata i stanične smrti (Viarengo i

sur., 2007). Promjena stabilnosti lizosomalnih membrana iznimno je brza promjena kada je riječ o izloženosti organizma onečišćujućim tvarima. Iz tog razloga se stabilnost lizosomalnih membrana u posljednja dva desetljeća koristi kao biomarker općeg stresa za procjenu fiziološkog stanja organizma izloženog onečišćujućim tvarima. Destabilizacija lizosomalnih membrana može biti inducirana okolišnim promjenama, kao što su hipoksija, hipertermija, osmotski šok ili prehrambena iscrpljenost.

1.4 Onečišćenje okoliša

U morskim ekosustavima dolazi do stalnog utjecaja antropogenih kemijskih onečišćivala koji imaju veliki utjecaj na morske organizme, a posebice na one koji žive u obalnim i estuarnim područjima (Turja, 2015).

1.4.1 Utjecaj metala

U morsku sredinu metali dospijevaju iz različitih izvora od kojih su najvažniji industrijski, poljoprivredni i urbani otpad. Glavni unos metala u okoliš je putem rijeka i atmosfere, a najveća količina unosi se putem brodskog otpada i izgaranjem goriva brodova (Gavrilović i sur., 2004). Najpoznatiji teški metali su kadmij, olovo i živa, te njihove minimalne količine mogu imati negativan učinak na organizme. Toksični utjecaj žive ovisi o njezinom obliku u morskoj vodi, te najtoksičniji oblik je metil živa (Gavrilović i sur., 2004). Kadmij ima veću mobilnost u organizmu od olova (Gavrilović i sur., 2004). Podaci ova tri teška metala u ukupnom mekom tkivu školjkaša pokazuju da je većina postaja uzduž istočne obale Jadrana, kada se gledaju maseni udjeli ovih teških metala, slična vrijednostima izmjerenima u neonečišćenim ili umjereno onečišćenim priobalnim područjima Jadranskog mora i Mediterana (Kušpilić i Precali, 2010; Tablica 1.). Razlog onečišćenja istočne obale Jadranskog mora s teškim metalima može biti zbog toga što su izvori teških metala mnogobrojni, a mogu biti prirodnog (atmosferski donos, ispiranje tla) i antropogenog porijekla (Kušpilić i Precali, 2010). Povišene vrijednosti metala zabilježene su u blizini gradskih i lučkih središta, te se istočno-jadranska obala smatra umjereno opterećenim područjem teškim metalima (Kušpilić i Precali, 2010). Teški metali se mogu pohraniti u sedimente, gdje se ne mogu vječno zadržati, te se postepeno s vremenom ispuštaju u vodeni stupac što ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima morske vode i postaju dostupni za žive organizme (Kljaković- Gašpić i sur., 2009; Peng i sur., 2009).

Neesencijalni metali, ako što su olovo, živa i kadmij mogu imati značajne posljedice na žive organizme, već i u prisutnosti vrlo niske koncentracije.

Tablica 1. Koncentracija metala izmjerena u mekom tkivu školjkaša (μg/g suhe mase).

Mjesto	Cd	Hg	Pb	Literatura
Ría de Arosa, Galicia	0.013	0.013	0.100	De los Ros i sur. 2018
Sjeverno Baltičko more	0.8-3.6	0.005-0.14	0.3-0.5	Turja 2015
Tirensko more	0.32-0.49	-	1.67-2.49	Conti i Cecchetti 2003
SZ Mediteran (luka Nica)	0.82-0.86	-	-	Roméo i sur. 2003
SZ Mediteran (luka Cannes)	0.782-0.837	-	-	Roméo i sur. 2003
Jadransko more (istočna obala)	0.99	0.25	4.21	Kljaković-Gaspić i sur. 2010
Crno more (obala Turske)	0.75-0.98	-	4.1-3.9	Bat i sur. 2012
Bohajsko more (Kina)	4.265-4.5	0.057-0.067	1.91-1.96	Wang i sur. 2005

1.4.2 Utjecaj eutrofikacije

U posljednjih nekoliko godina eutrofikacija je postala sve češća pojava u morskim okolišima. Na pojavu eutrofikacije, značajan utjecaj imaju donosi hranjivih tvari putem rijeka, te može imati i drastične posljedice na morske organizme. Iz tog razloga važno je njezino praćenje i uveden je trofički indeks za procjenu stupnja eutrofikacije. Trofički indeks se temelji na procjeni količine klorofila, zasićenja kisikom, mineralima i ukupnom dušiku i fosforu, a odnosi se na priobalne morske vode (Vollenweider i sur., 1998). Uvođenjem trofičkog indeksa – TRIX (Vollenweider i sur., 1998) moglo se pristupiti klasifikaciji stanja i kakvoće priobalnih voda na osnovi definiranih raspona za pojedine granice stanja (Kušpilić i Precali, 2010; Tablica 2.).

Tablica 2. Klasifikacija priobalnih voda obzirom na stupanj eutrofikacije (zSd - prozirnost; γ- udio otopljenog kisika; c (TIN, TP, Chla) - koncentracije ukupnog otopljenog anorganskog dušika, ukupnog fosfora i klorofila a; Kušpilić i Precali, 2010).

Ekološko stanje Stupanj eutrofikacije Boja	zSd/m	Y (O2/O2')	C (TIN) mmol m^{-3}	C (TP) mmol m^{-3}	C (Chla) mg m^{-3}	Trix	Uvjeti
Slabo Ekstremno eutrof. Narančasta	< 3	p - > 1,7 d – 0,0-0,3	>20	> 1,3	> 10	6 – 8	visoka produktivnos, obojenost, ugibanje bentoskih org.
Umjereno dobro Eutrofno Zuta	< 3	p - >1,7 d – 0,3-0,8	10 – 20	0,6 – 1,3	5 – 10	5 – 6	visoka produktivnost, povremena obojenost, hipoksija i privremene anoksije
Dobro Mezotrofno Zelena	3 – 10	p - >1,2-1,7 d – 0,3-0,8	2 – 10	0,3 – 0,6	1 – 5	4 – 5	srednja produktivnost, povremena obojesnost, privremene hipoksije
Vrlo dobro Oligotrofno Plava	>10	0,8-1,2	< 2	< 0,3	< 1	2 - 4	niska produktivnost, obojenost odsutna, odsutnost hipoksija

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

1) Analizirati stabilnost lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih na postajama u sjevernom dijelu Jadranskog mora.

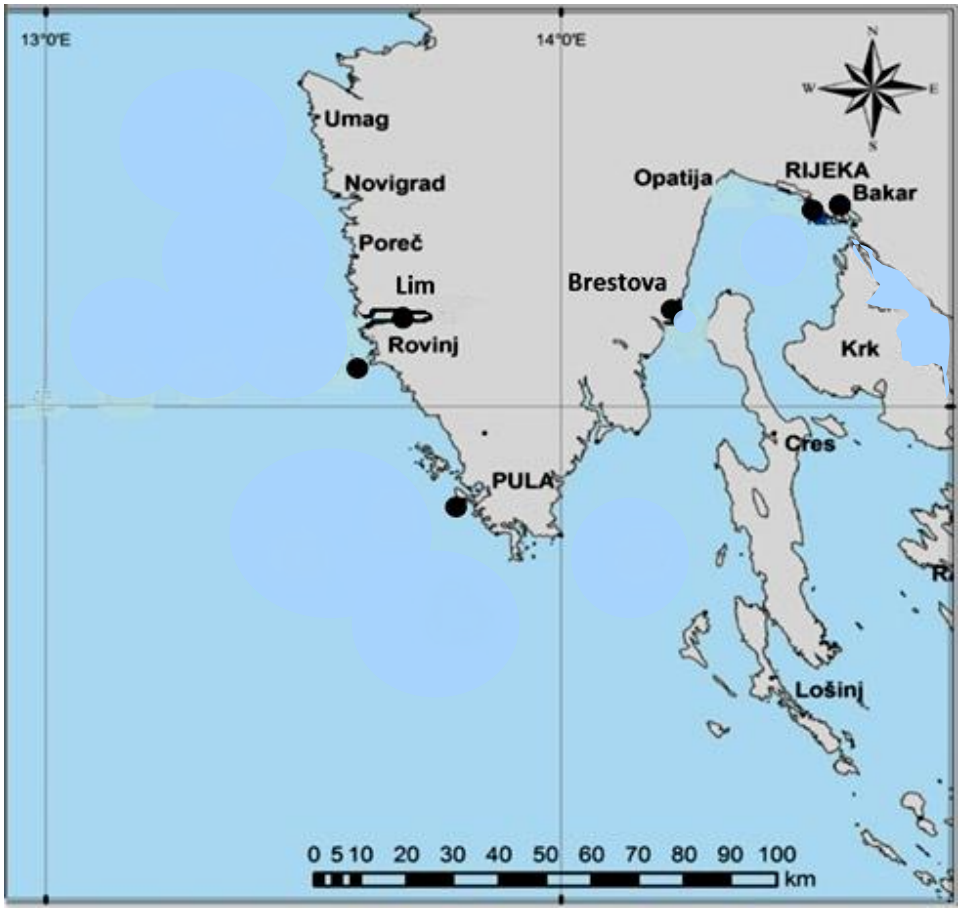
2) Odrediti stupanja onečišćenja na postajama u sjevernom Jadranu na temelju podataka iz literature.

3) Usporediti analizirane parametre u probavnim žlijezdama dagnji *Mytilus galloprovincialis* na različitim mjestima uzorkovanja s podacima prikupljenih iz literature.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Područje istraživanja

Uzorci dagnje (N=5), *M. galloprovincialis* Lamarck 1819. sakupljeni su u kolovozu 2016. godine na šest postaja u sjevernom Jadranu: Limski zaljev, Rovinj, Pula, Brestova, Rijeka i Bakar (Slika 5.).



Slika 5. Mjesta uzorkovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu na postajama: Limski zaljev, Rovinj, Pula, Brestova, Rijeka i Bakar (•).

Kontrolna postaja koja se nalazi u unutarnjem dijelu Limskog zaljeva (44º58' S, 13º44' I) je zaštićeno područje i poznato je po proizvodnji dagnji u marikulturi. Iz tog razloga postaja Lim je neonečišćena postaja, ali zbog povećenog prirodnog donosa organskog materijala, česte su pojave eutrofikacije (Tudor i Marasović, 2008). Postaja ACI Marina Rovinj (45º04' S, 13º38' I) je dio urbaniziranog područja, te je pod utjecajem voda koje dolazi iz tvornice prerade ribe Mirna, otpadnih voda iz kanalizacija i voda koje su vezane uz turističke i ribarske brodove. Postaja ACI

Marina Pula (44º53 'S, 13º51' I) nalazi se u neposrednoj blizini visoko urbaniziranog područja sa 64 000 stanovnika, gdje se nalaze luka i brodogradilište koji ispuštaju velike količine urbanih i industrijskih otpadnih voda (Jakšić i sur. 2005). Postaja Brestova (45º09 'S, 14º14' I) nalazi se u blizini ribarskog naselja Brestova i trajektne luke, ali je relativno udaljena od izvora onečišćujućih tvari (Perić i sur. 2012). Postaja Rijeka (45º20 S', 14º26' I) nalazi se na mjestu luke, pod velikim je utjecajem brodogradilišta i otpušta se velika količina urbanih i industrijskih otpadnih voda bez prethodnog pročišćavanja (Jakšić i sur. 2005). Postaje Pula i Rijeka nalaze se u blizini visoko urbaniziranih područja i industrijskih objekata, te su izložene mješavini različitih onečišćujućih tvari (Perić i sur. 2012). Postaja Bakar (45º18 'S, 14º33' I) nalazi se u blizini bivše tvornice koksa u razdoblju od 1976. do 1995. gdje je tijekom prošlog stoljeća provedena sanacija onečišćenog zemljišta i osim toga ovo područje također prima efluente iz grada Bakra (Perić i sur. 2012).
Procjena koncentracije metala i eutrofikacije na istraživanim postaja očitana je iz studije Kušpilić i Precali (2010).

3.2 Uzorkovanje školjkaša

Po deset jedinki dagnji prosječne duljine 5 ± 1 cm, uzorkovane su iz prirodnih staništa. Jedinke su nakon uzorkovanja, u spremnicima s morskom vodom, prenesene u laboratorij gdje se unutar jednog sata od uzorkovanja izoliralo tkivo.

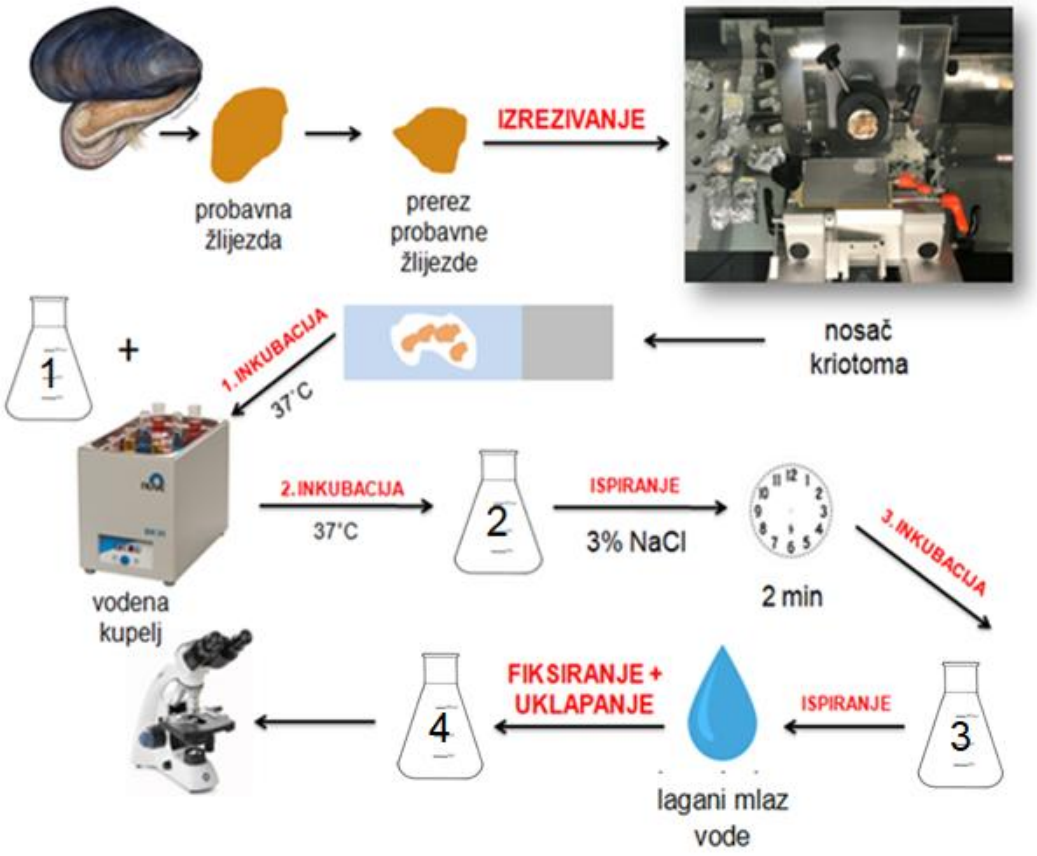
3.3 Izolacija i priprema tkiva

Tkivo probavne žlijezde isječeno je škaricama. Polovice probavne žlijezde naglo su smrznute u N-heksanu, koji je prethodno ohlađen u tekućem dušiku. Tako obrađeni uzorci pohranjeni su na -80 ºC, do pripreme histoloških preparata.

Prije kriosekcije, uzorci su pričvršćeni za nosač mikrotoma i uklopljeni u medij O.C.T.^{TM} (Microm Inc. GmbH, Germany) (Kovačić, 2015). Uzorci žlijezdi smješteni su na nosač kriotoma (Zeiss Hyrax C 50, Microm GmbH, Germany) prethodno ohlađenim na -30 ºC.

3.4 Određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana

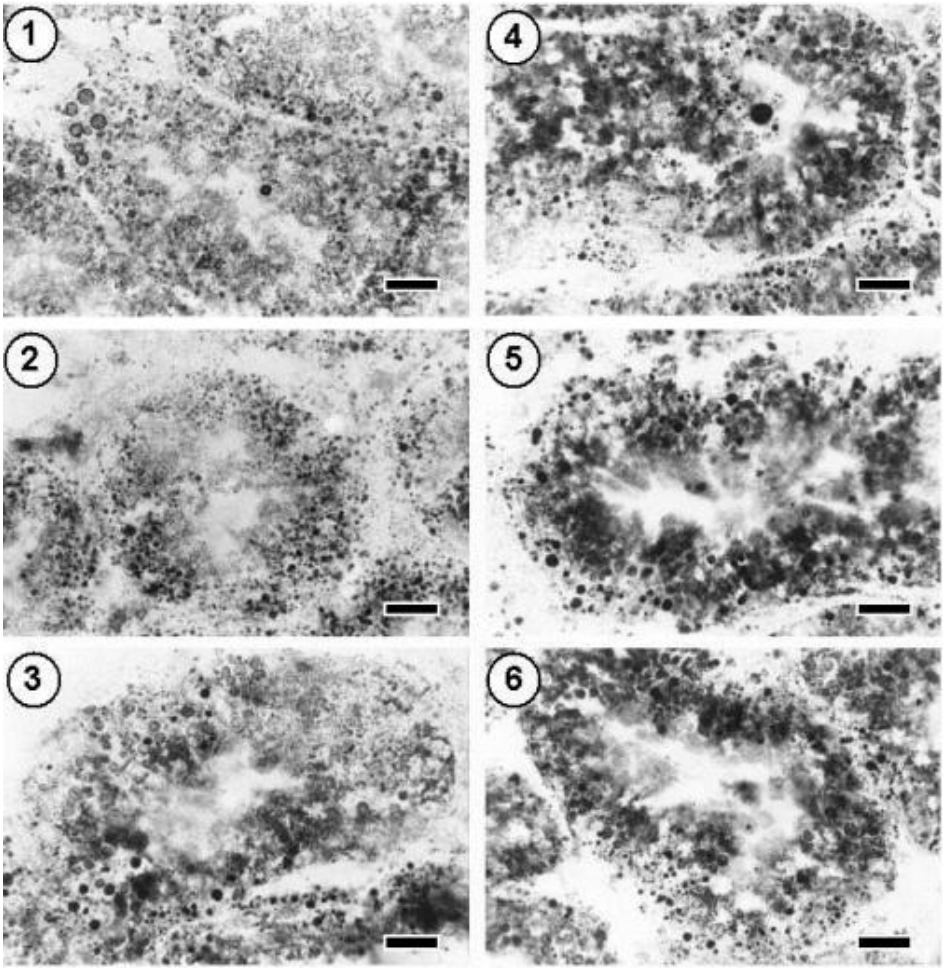
Stabilnost lizosomalne membrane određena je histokemijskom metodom po Moore-u (1976). Poprečni prerezi probavnih žlijezdi postavljeni su na nosač kriotoma prethodno ohlađenog na -30 ˚C, nakon čega se provodi izrezivanje probavnih žlijezdi (Kovačić, 2015). Za pojedini uzorak od pet žlijezda pripremljeno je 8 preparata prereza debljine 10 μm. Na predmetno stakalce prethodno zagrijano na sobnoj temperaturi naneseni su smrznuti prerezi, a zatim su inkubirani u vodenoj kupelji na 37 ˚C u labilizirajućem citratnom puferu (0,1M Na-citratni pufer, 2.5% NaCl, pH 4,5) u vremenima od 2, 5, 10, 15, 20, 30 i 40 minuta. Tijekom inkubacije dolazi do destabilizacije lizosomalnih membrana, zahvaljujući djelovanju labilizirajućeg pufera. Nakon samog djelovanja labilizirajućeg pufera, slijedi druga inkubacija u vodenoj kupelji pri temperaturi od 37 ˚C u otopini supstrata naftol As- Bi N- acetil β–D glikozaminid-a (Sigma – Aldrich, USA) na 20 minuta u mraku. Nakon druge inkubacije, preparati se ispiru 3%-tnom otopinom NaCl-a 2 minute pri sobnoj temperaturi. Zatim slijedi treća inkubacija u otopini diazonijeve soli (1 mg/ml Fast Violet, 0,1 M Na-fosfatni pufer), koja ujedno i boji preparate, pri sobnoj temperaturi 10 minuta u mraku. Neposredno nakon bojanja, preparati se ispiru pod laganim mlazom vode u trajanju od 5 minuta. Nakon bojanja, preparati se fiksiraju u stabiliziranom fiksativu (Ca-formal 2% Ca-acetat, 10% formaldehid) 10 minuta pri temperaturi od +4 ˚C. Preparati se uklapaju u glicerol želatinu (Sigma – Aldrich, USA; Slika 6.). Stabilnost lizosomalnih membrana, tj. intenzitet bojanja se procjenjuje pomoću svjetlosnog mikroskopa Nikon- SA povezanim s CCD kamerom Ikeagami ICD- 803P, a analiza slika se provodi pomoću programa Lucija 4,60.



Slika 6. Shematski prikaz histokemijske metode po Moore-u za određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana (1 - 0,1M Na-citratni pufer, 2 - naftol As- Bi N-acetil β–D glikozaminid, 3 – otopina diazonijeve soli, 4 – stabilizirani fiksativ + glicerol želatina).

Određivanje stabilnosti lizosomalne membrane temelji se na mjerenju aktivnosti enzima N–acetil β-D heksozaminidaze, a destabilizacija ili slabljenje lizosomalne membrane temelji se na povećanoj permeabilnosti membrane za supstrat (naftol AS - BI N-acetil β-D-glukozaminid) (Kovačić, 2015). Dodavanjem diazonijeve soli, reakcija enzima i supstrata u lizosomu postaje vidljiva. Labilizacijski period (LP) je vrijeme potrebno za proizvodnju maksimuma obojenja lizosoma (Moore, 1976). Na početku reakcije intenzitet obojenja je slab jer ne dolazi do ulaska supstrata u lizosome zbog visoke stabilnost lizosomalne membrane. Što duže traje inkubacija dolazi do destabilizacije membrane, povećava se propusnost membrane za supstrat i intenzitet obojenja raste. Vrijeme inkubacije u kojem je postignuto maksimalno obojenje preparata predstavlja vrijeme potrebno za potpunu destabilizaciju lizosomalne membrane (LP) (Moore, 1976). Nakon potpune destabilizacije lizosomalne

membrane, dolazi do degradacije membrane, ispuštanja lizosomalnog sadržaja i opadanja intenziteta obojenja (Slika 7.). Vrijednosti LP iznad 20 minuta ukazuju na visoku stabilnost lizosomalne membrane i dobro zdravlje dagnji, dok vrijednosti od 10 do 20 minuta i ispod 10 minuta ukazuju na stresne i ozbiljne stresne uvijete (Viarengo i sur., 2007).



Slika 7. Obojane kriostatske sekcije probavne žlijezde koje pokazuju aktivnost N–acetil β-D heksozaminidaze u lizosomalnom vakuolnom sustavu probavnih stanica. Slika 1 – 6: sekcije prethodno obrađene na pH 4.5 i 37˚C tijekom 2- 25 minuta (2, 5, 10, 15, 20, 25 minuta. Odjeljak 5. pokazuje maksimalni intenzitet bojanja, dok odjeljak 6. pokazuje smanjenje intenziteta bojanja koja označava vjerojatni gubitak enzima difuzijom iz potpuno destabilizacija lizosoma (Martínez-Gómez i sur., 2015).

3.5 Prikaz i statistička obrada rezultata

Za statističku analizu i grafičke prikaze korišten je program Statistica 9.0. Koeficijenti korelacije za stabilnost lizosomalnih membrana (SLM), koncentraciju metala u

tkivima školjkaša i vrijednosti TRIX-a određeni su pomoću Spearmanovog neparametrijskog testa korelacije, s razinama značajnosti od < 0,05 za koncentracije metala i < 0,01 za TRIX.

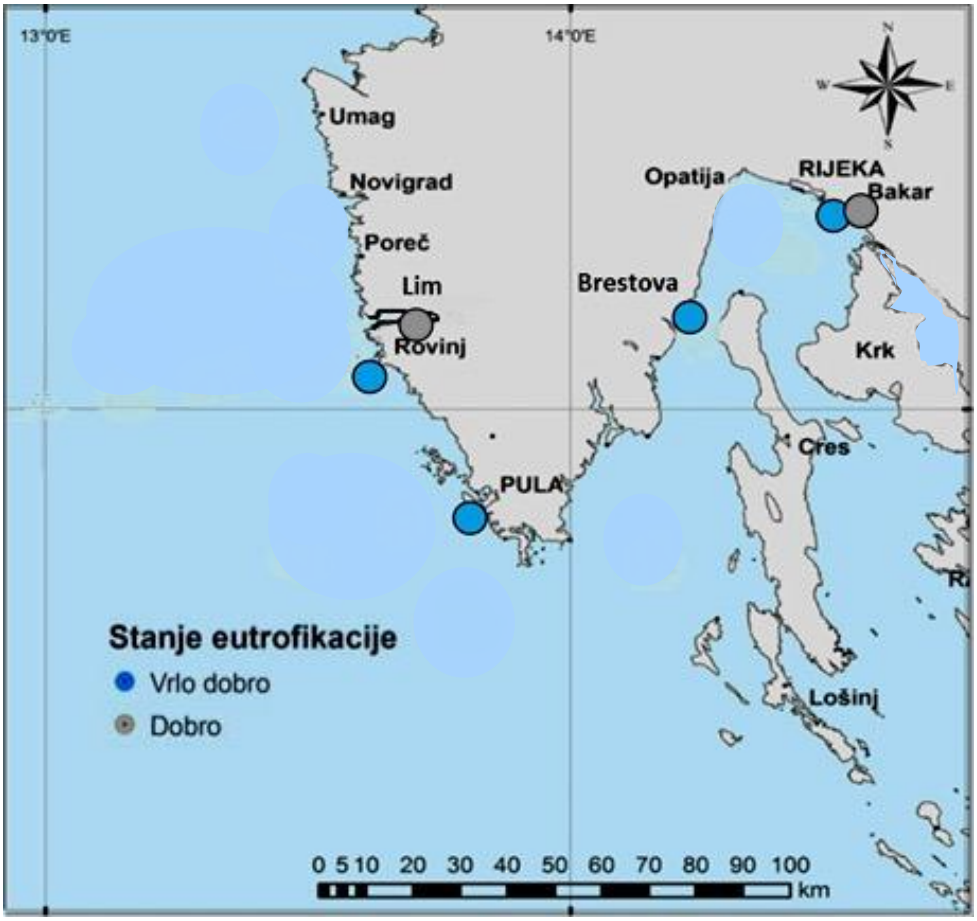
4 REZULTATI

4.1 Karakterizacija postaja

Prema studiji Kušpilić i Precali (2010) opisani su fizikalno-kemijski i biološki parametri na postajama u sjevernom Jadranu koje su se koristile kao područja uzorkovanja dagnji *M. galloprovincialis*. Opisan je TRIX i koncentracija teških metala u mekom tkivu školjkaša.

4.1.1 Trofički indeks na postajama sjevernog Jadrana

Prema TRIX-u postaje Rovinj, Pula, Brestova i Rijeka okarakterizirane su kao vrlo dobre, a postaje Lim i Bakar kao dobre (Slika 8.).



Slika 8. Stanje eutrofikacije (izraženo preko TRIX-a) na postajama sjevernog Jadrana istraženim tijekom 2005. godine za potrebe „Projekta Jadran“ (Kušpilić i Precali, 2010).

4.1.2 Koncentracije teških metala na postajama sjevernog Jadrana

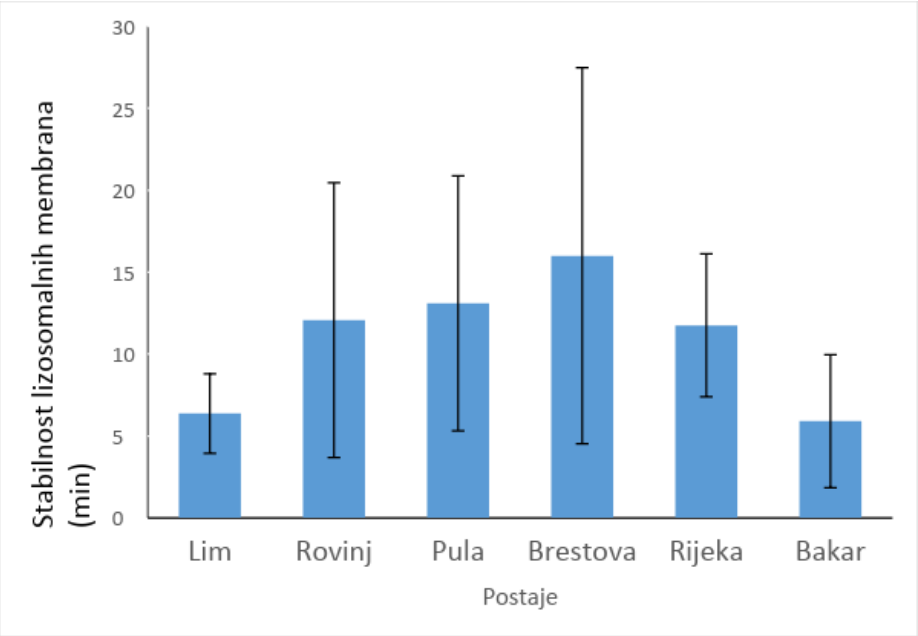
Koncentracije metala kadmija (Cd) kreću se od 0.5 do 1.15 u mekom tkivu školjkaša kao što je prikazano u Tablici 3. Najmanja je izmjerena koncentracija metala kadmija u mekom tkivu školjkaša s postaje Pula, a najveća s postaje Rijeka. Koncentracije metala žive (Hg) nešto su niže od koncentracija kadmija, te se kreću od 0.1 do 0.4 u mekom tkivu školjkaša kao što je prikazano u Tablici 3., pri čemu koncentracija metala žive nije detektirana na postaji Lim unutra. Koncentracije metala olova (Pb) kreću se od 0.6 do 1.2 u mekom tkivu školjkaša kao što je prikazano u tablici Tablica 3. Iznimno visoke koncentracije metala olova izmjerene su u mekom tkivu školjkaša sa postaja Brestova, Rijeka i Pula.

Tablica 3. Koncentracije metala kadmija (Cd), žive (Hg) i olova (Pb) u mekom tkivu školjkaša.

Postaja	Cd	Hg	Pb
Lim unutra	0.6	0	0.6
Pula	0.5	0.2	8
Brestova	0.8	0.1	1.2
Rijeka	1.15	0.2	9
Bakar	0.9	0.4	5

4.2 Stabilnost lizosomalnih membrana

Stabilnost lizosomalih membrana (min) u probavnim žlijezdama dagnji uzorkovanih na postajama u sjevernom Jadranu prikazane su na slici Slika 9. Dobivene srednje vrijednosti stabilnosti lizosomalnih membrana kreću se od 5.5 min na postaji Bakar do 16 min na postaji Brestova, gdje na postaji Brestova maksimalna vrijednost iznosi 27.5 min.



Slika 9. Stabilnost lizosomalnih membrana u dagnjama uzorkovanim na postajama Lim, Rovinj, Pula, Brestova, Rijeka i Bakar u sjevernom Jadranu tijekom srpnja 2016. godine.

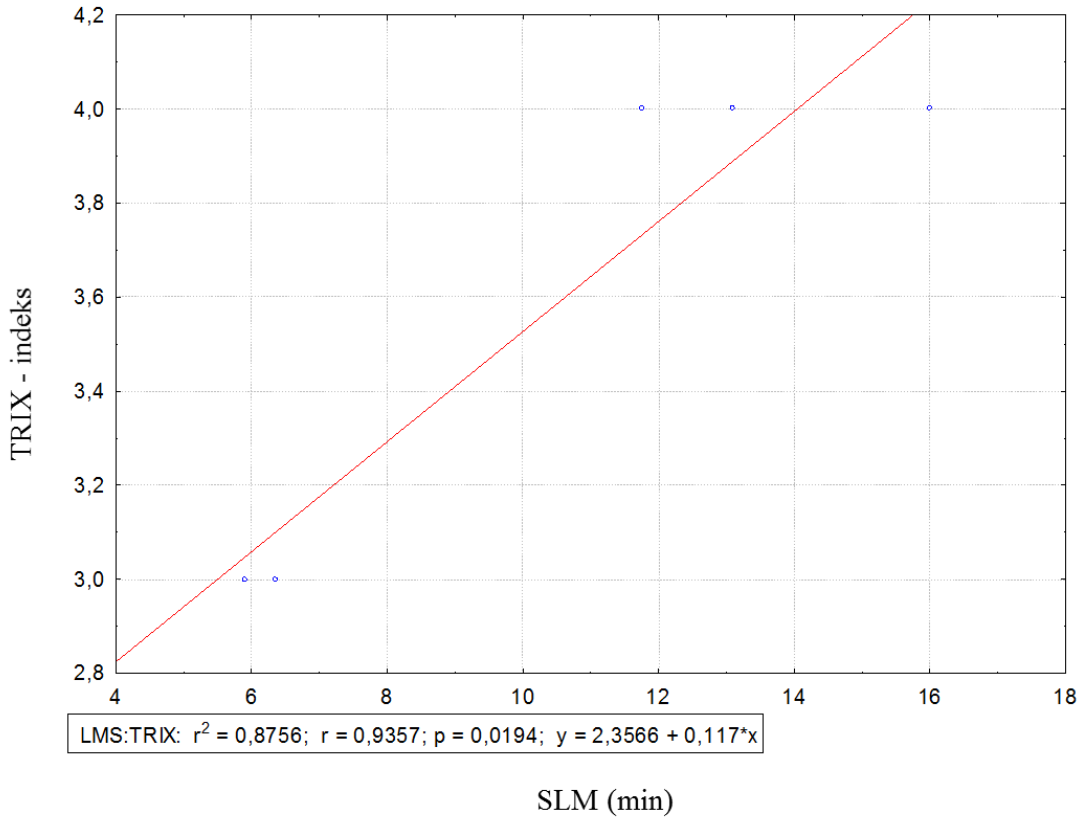
Koncentracija kadmija ($R = -0,30$, $p < 0,05$) i žive ($R = -0,35$, $p < 0,05$) je korelirana sa mjerenim parametrom stabilnosti lizosomalnih membrana, te ukazuje na negativnu povezanost između parametara. Dobiveni koeficijent korelacije između koncentracije olova i stabilnosti lizosomalnih membrana ukazuje na to da nema povezanosti između ta dva parametra. Najveća korelacija zabilježena je između trofičkog indeksa i stabilnosti lizosomalnih membrana ($R = 0, 93$, $p < 0,01$). Vrijednosti koeficijenata korelacije prikazani su u tablici Tablica 4.

Tablica 4. Rezultati Spearmanove analize korelacijskih koeficijenata izračunatih za stabilnost lizosomalnih membrana (SLM), izmjerenu koncentraciju metala u tkivu školjkaša i TRIX.

metali/SLM	Cd	Hg	Pb	TRIX
SLM	-0,30 *	-0,35*	0,15*	0,93**

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Vrlo dobra povezanost uočena je između SLM i trofičkog indeks (TRIX) koja je prikazana grafički (Slika 10.).



Slika 10. Korelacija između stabilnosti lizosomalnih membrana (SLM) i stupnja eutrofikacije praćenog preko TRIX-a.

5 RASPRAVA

U ovome radu istražen je biološki odgovor dagnje *M. galloprovincialis* na prisutnost teških metala i trofičkog indeksa koji je proučavan mjerenjem stabilnosti lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi.

Istraživanje je provedeno na dagnjama uzorkovanih s pet postaja, na kojima se gledao utjecaj teških metala kadmija, olova i žive stupanje eutrofikacije. Nešto viša vrijednost TRIX-a utvrđena je na postajama Lim i Bakar. Slične vrijednosti su dobivene na postaji Bakar zbog nekadašnjeg utjecaja tvornice koksa, ali i sadašnjih antropogenih učinaka. Postaja Lim je uzgajalište, ali je i udaljenija od otvorenog mora zbog čega dolazi do rjeđeg prozračivanja vertikalnih slojeva kanala (Tudor i Marasović, 2008). Niske vrijednosti trofičkog indeksa dobivene su na postajama Rovinj, Pula, Brestova i Rijeka, što može biti razlog manjeg donosa hranjivih tvari i izravnog doticaja s otvorenim morem. Najveće koncentracije teških metala kadmija i olova prisutne su na postaji Rijeka, što može potvrditi i veliki antropogeni utjecaj na toj postaji, dok je najveća koncentracija metala žive prisutna na postaji Bakar, koja je stalno izložena efluentima iz grada Bakra. Najmanje koncentracije metala prisutne su na postajama Brestova i Lim, koje su ujedno poslužile i kao kontrolne postaje, a i udaljene su od izvora onečišćenja. Koncentracije kadmija u mekom tkivu školjkaša na postajama Lim, Brestova i Bakar mogu se usporediti s koncentracijama kadmija u sjeverozapadnom Mediteranu (Kušpilić i Precali, 2010; **Tablica 1.**; **Tablica 3.**), dok su koncentracije na postaji Rijeka nešto veće i usporedive sa Sjevernim Baltičkim morem i Bohajskim morem (Kušpilić i Precali, 2010; **Tablica 1.**; **Tablica 3.**). Koncentracije žive u mekom tkivu školjkaša na svim postajama su približno slične prosječnoj vrijednosti za Jadransko more, ali je koncentracija dvostruka na postaji Bakar s obzirom na Jadransko more, te se približava vrijednostima u Bohajskom moru (Kušpilić i Prekali, 2010; **Tablica 1.**; **Tablica 3.**). Koncentracije olova u mekom tkivu školjkaša na postaji Rijeka i Pula su daleko iznad prosjeka koncentracija u Jadranskom moru, sjeverozapadnom Mediteranu, Bohajskom moru, Tirenskom moru, Sjeverno Baltičkom moru i Crnom moru (Kušpilić i Precali, 2010; **Tablica 1.**; **Tablica 3.**).

Lizosomi, a tako i lizosomalne membrane vrlo su osjetljive na minimalne koncentracije onečišćujućih tvari (Martínez-Gómez i sur., 2015), što je vidljivo i iz

ovog istraživanja (**Slika 9.**). Stabilnost lizosomalnih membrana utvrđena je histološkom analizom, pri čemu dolazi do bubrenja ili pucanja lizosomalnih mjehurića u prisutsvu velike količine onečišćujućih tvari zbog njihove akumulacije u lizosomima kao glavnom mjestu unutarstanične probave dagnje. Najveća stabilnost lizosomalnih membrana utvrđena je u dagnjama koje su uzorkovane na postaji Brestova, a najmanja stabilnost lizosomalnih membrana u dagnjama uzorkovanih na postaji Bakar i Lim. Slični rezultati dobiveni su u istraživanju Perić i sur. (2012) na navedenim postajama u sjevernom Jadranu. Niska stabilnost lizosomalnih membrana na postaji Bakar ukazuje na vrlo stresne uvjete, što može biti razlog poklapanja višeg trofičkog indeksa i velikog utjecaja teških metala, kao što je dokazano u brojnim istraživanjima (Domouhtsidou i sur. 2004; Koukouzika i Dimitriadis, 2005; Petrović i sur. 2001; Viarengo i sur. 1987). Niska stabilnost lizosomalnih membrana na postaji Lim, vjerojatno nije razlog utjecaja teških metala, već prisustva eutrofikacije što je česta pojava prisutna u sjevernom Jadranu u zadnjih nekoliko godina (Degobbis i sur. 1979; Degobbis i sur. 1989; Filipić 1990). Najmanji utjecaj na stabilnost lizosomalnih membrana ima povećana koncentracija olova što može biti razlog njegove male mogućnosti mobilnosti u organizmu, dok najveći utjecaj ima trofički indeks (Gavrilović i sur. 2004).

Prema ovim rezultatima sve postaje bi bile ocijenjene prema istraživanom parametru da su pod stresnim uvjetima (labilizacijski period ispod 20 minuta) (Perić i sur., 2012). Međutim, u nekim slučajevima promjena ekoloških čimbenika (primjerice povećana temperatura mora, smanjeni salinitet, povećanje trofičkog indeksa) može utjecati na fiziološko stanje organizma, a time i na pokazatelje općeg stresa poput stabilnosti lizosomalne membrane (Kovačić 2015; Perić i sur. 2012).

6 ZAKLJUČAK

1) Teški metali utvrđeni na ispitivanim postajama imaju utjecaj na stabilnost lizosomalnih membrana u probavnim žlijezdama dagnje *Mytilus galloprovincialis*.

2) Stupanj eutrofikacije određenog područja utječe na dagnju, te se očituje u smanjenju stabilnosti lizosomalne membrane na području Limskog kanala i Bakra.

3) Stabilnost lizosomalnih membrana je parametar koji ukazuje na stresne uvjete u dagnji *Mytilus galloprovincialis*, a time i u okolišu.

4) U procjenama stanja morskog okoliša potrebno je koristiti više parametara (biomarkera) koji će moći ukazati na onečišćenje u okolišu jer ponekad promjene ekoloških čimbenika mogu "maskirati" utjecaj onečišćivala.

7 LITERATURA

7.1 Knjige, znanstveni i stručni radovi

Aarab, N., Pampanin, D. M., Naevdal, A., Oysaed, K. B., Gastaldi, L., Bechmann, 2008. Histopathology alterations and histochemistry measurements in mussles, Mytilus edulis collected offshore from an aluminium smelther industry (Norway). Marine Pollution Bulletin 57, 569 – 574.

Alam, M.N., Chowdhury, M.I., Kamal, M., Ghose, S., Matin, A.K.M.A., Ferdousi, G.S.M., 1999. Radionuclide concentrations in mussels collected from the southern coast of Bangladesh. Journal Environmental Radioactivity 47, 201-212.

Allison, A.C. 1969. Lysosomes and cancer. In: Lysosomes in Biology and Pathology, J.T. Dingle and H.B. Fell (eds). North Holland/American Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, 1969.Vol 2, pp. 178–204.

Bat, L., Ustun, F. i Baki, O.G, 2012. Trace Element Concentrations in the Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis Lamarck*, 1819 Caught from Sinop Coast of the Black Sea, Turkey. The Open Marine Biology Journal 6, 1-5.

Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis from Adriatic Sea. Chemosphere 65, 913-921.

Branch, G. M., Steffani, C. N., 2004. Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 300, 189- 215.

Carlton J.T. (1992.) Introduced Marine and Esturine Mollusks of North America: An End-of-the-20th-century Perspective. Journal of Shellfish Research 11(2): 489-505.

Corti, M.E. i Cecchetti G. 2003. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. Environmental Research 93, 99-112.

Cooper, G., Hausman, R., 2004. Stanica - molekularni pristup. Medicinska naklada d.o.o., Zagreb, 356-397.

Degobbis, D., N. Smodlaka, I. Pojed, A. Skrivanić, R. Precali, 1979: Increased eutrofication of the Northern Adriatic sea. Marine Pollution Bulletin 10, 298—301.

Degobbis, D., 1989: Increased eutrofication of the Northern Adriatic sea-Second act. Marine Pollution Bulletin 20, 452—457.

Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., Cajaraville, M.P., 2004. Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland cells of the mussel Mytilus galloprovincialis (L.) in relation to function. Journal of Molecular Histology 35, 501-509.

Domouhtsidou, G. P., Dailianis, S., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V. K., 2004. Lysosomal membrane stability and methallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.), as biomarkers Combination with trace metal concentrations. Marine Pollution Bulletin 48, 572-586.

Franzellitti, S., Buratti, S., Donnini, F., Fabbri, E., 2010. Exposure of mussels to a polluted environment: Insights into the stress syndrome development. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 152, 24 – 33.

Filipić, B. 1990. "Cvatnje mora" u sjevernom Jadranu u proljetno – ljetnom razdoblju 1988. godine. Acta Botanica Croatica 49, 53-61.

Gaylord B., Blanchette C. A., Denny M. W. (1994): Mechanical consequences of size in wave–swept algae. Ecological Monographs 64, 287–813.

Gavrilović, A., Srebočan, E., Petrinec, Z., Pompe-Gotal, J. i Prevendar-Crnić, A. 2004. Teški metali u kamenicama i dagnjama Malostonskog zaljeva. Naše more 51, 1-2.

Gosling, E. M. (1992): Systematics and geographic distribution of Mytilus. In: Gosling, E. M. (ed.) The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture Developments in Aquaculture and Fisheries. Elsevier, Amsterdam. 1–20 pp.

Griffiths C. L., Hockey P. A. R., van Erkom Schurink C., Le Roux P. J. (1992): Marine invasive aliens on South African shores: Implications for community structure and trophic functioning. South African Journal of Marine Science 12, 713–722.

Hockey C. L., van Erkom Schurink C. (1992): The invasive biology of the mussel Mytilus galloprovincialis on the southern African coast. Transactions of the Royal Society of South Africa 48, 123–139.

ICES. 2004. Biological effects of contaminants: Measurement of lysosomal membrane stability. By M.N. Moore, D. Lowe, and A. Köhler. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, No. 36. 31 pp.

Jakšić, Ž., Batel, R., Bihari, N., Mičić, M., Zahn, R.K., 2005. Adriatic coast as a microcosm for global genotoxic marine contamination—A long-term field study. Marine Pollution Bulletin 50, 1314- 1327.

Kljaković- Gašpić, Z., Bogner, D. i Ujević, I. 2009. Trace metals (Cd, Pb, Cu, Zn and Ni) in sediment of the submarine pit Dragon ear (Soline Bay, Rogoznica, Croatia). Environmental geology 58, 751- 760.

Kljaković- Gašpić, Z., Herceg-Romanić, S., Kožul, D. i Veža, J. 2010. Biomonitoring of organochlorine compounds and trace metals along the Eastern Adriatic coast (Croatia) using *Mytilus galloprovincialis.* Marine Pollution Bulletin 60, 1879-1889.

Koukouzika, N. i Dimitriadis, V. K. 2005. Multiple Biomarker Comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece Coast: "Lysosomal Membrane Stability, Neutral Red Retention, Micronucleus Frequency and Stress on Stress". Ecotoxicology 14, 449-463.

Kovačić I. 2015 Aktivnost kisele deoksiribonukleaze i histokemijske promjene u lizosomima kao odgovor dagnje *Mytilus galloprovincialis* na čimbenike u okolišu. Doktorska disertacija, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Krmpotić, M., Rožmarić, M., Baršić, D. 2015. Mussels (Mytilus galloprovincialis) as a bio-indicator species in radioactivity monitoring of Eastern Adriatic coastal waters. Journal of Environmental radioactivity 144, 47-51.

Kušpilić, G. i Precali, R. (2010) Karakterizacija područja i izrada prijedloga programa i provedba monitoringa stanja voda u prijelaznim i priobalnim vodama Jadranskog mora prema zahtjevima okvirne direktive o vodama EU (2000/60/EC)

Lee, S.Y. i Morton, B.S., 1985. The introduction of the mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis into Hong Kong. Malacolgical Review 18, 107-109.

Martínez-Gómez, C., Bignell, J. and Lowe, D. 2015. Lysosomal membrane stability in mussels. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences No. 56. 41 pp

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc- Habdija, B., 1998. Beskralješnjaci- biologija nižih avertebrata, III. prerađeno i dopunjeno izdanje. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Školska knjiga, Zagreb.

Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, Mytilus edulis, and changes induced by thermal stress. Cell and Tissue Research 175, 279-287.

Moore, M.N., Livingstone, D.R., and Widdows, J. 1988. Hydrocarbons in marine molluscs: biological effects and ecological consequences. In Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, pp. 291–328. Ed. by U. Varanasi. CRC Press, Boca Raton, Florida.

McDonald, J.H. i Koehn, R.K., 1988. The mussels Mytilus galloprovincialis and M. trossulus on the Pacific coast of North America. Marine Biology 99, 111-118.

McDonald, J.H., Koehn, R.K., Balakirev, E.S., Manchenko, G.P., Pudovkin, A.I., Sergiyevskii, S.O. i Krutowskii, K.V., 1990. Species identity of the “common mussel” inhabiting the Asiatic coasts of the Pacific Ocean. Soviet Journal of Marine Biology 16, 10-18.

Owen G. (1972.) Lysosomes, peroxisomes and bivalves. Science Progress 60, 299-318.

Peng, J., Song, Y., Yuan, P., Cui, X. i Qui, G. 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. Journal of Hazardous Materials 161, 633 – 640.

Perić, L., Smodlaka Tanković, M., Ravlić, S., 2012. Evaluation of marine water quality along North-Eastern Adriatic coast based on lysosomal membrane stability in mussels Mytilus galloprovincialis Lam. A long term study. Acta Adriatica 53, 457-466.

Petrović, S., Ozretić, B., Krajnović-Ozretić, M., Bobinac, D. 2001. Lysosomal membrane stability and Metallothioneines in digestive gland of mussels (*Mytilus*

galloprovincialis Lam.) as biomarkers in a field study. Marine Pollution Bulletin 42, 1373-1378.

Roméo, M., Hoarau, P. i Garello, G. 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. Environmental Pollution 122, 369-378.

Štambuk A., Šrut M., Šatović, Z., Tkalec M., Klobučar G. I. V. (2013): Gene flow vs. pollution pressure: Genetic diversity of Mytilus galloprovincialis in eastern Adriatic. Aquatic Toxicology 136– 137: 22–31.

Teskeredžić, E., Teskeredžić, Z., Legović, T., Branica, M., Tomec, M., Kwokal, Ž., Picer, M., Raspor, B., Picer, N., Klarić, D., Ahel, M., Terzić, S., Ćosović, B. 2004. Studija utjecaja na okoliš za objekte akvakulture u zoni ušća rijeke Krke. Zagreb, 2-46, 59-74, 114-36.

Tudor, M. i Marasović, I., 2008. Studija o utjecaju na okoliš. Uzgajališta bijele ribe u Limskom zaljevu.

Turja, R. 2015. Biological Effects of Contaminants in Mussels (*Mytilus trossulus*) Transplanted in Northern Baltic Sea Coastal Areas. Academic dissertation, Helsinki, University of Helsinki, Faculty of Biological and Environmental Sciences

Usheva, L. N., Vaschenko, M. A. i Durkina, V. B. 2006. Histopathology of the Digestive Gland of the Bivalve Mollusk Crenomytilus grayanus (Dunker, 1853) from Southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. Russian Journal of Marine Biology 32, 166-172.

Viarengo, A., Moore, M. N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R. K. i Farrar, S.V. 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthene. Marine Biology 94, 251-257.

Viarengo, A., Nicotera, P. 1991. Possible role of Ca2+ in heavy metal cytotoxicity. Comparative Biochemistry and Physiology 100, 81–84.

Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology 104, 355-372.

Vollenweider, R. A., Giovanardi, F., Montanari, G. i Rinaldi, A., 1998. Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters with special reference to the NW Adriatic sea: Proposal for a trophic scale, turbidity and generalized water quality index. Environmentrics 9, 329-357.

Viarengo, A. D. Lowe, C. Bolognesi, R. Fabbri, A. Koehler. 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant – induced stress syndrome in sentinel organisms. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 146, 281-300.

Wang, Y., Liang, L., Shi, J. i Jiang, G. 2005. Study on the contamination of heavy metals and their correlations in mollusks collected from coastal sites along the Chinese Bohai Sea. Environment International 31, 1103-1113.

Wilkins, N.P., Fujino, K. i Gosling, E.M., 1983. The Mediterranean mussel Mytilus galloprovincialis Lmk. in Japan. Biological Journal of the Linnean Society 20, 365-374.

Župan, I. i Šarić, T. 2014. Prirast i indeks kondicije – dva važna čimbenika u uzgoju dagnji. MESO 3, 255-259. Stručni rad.

7.2 Internetski izvori

Baza podataka i pokazatelja stanja morskog okoliša, marikulture i ribarstva, Agencija za zaštitu okoliša

http://baltazar.izor.hr/azopub/bindex 1.07.2018.

8 POPIS SLIKA

Slika 1. Mediteranska dagnja – *Mytilus galloprovincialis.* (izvor: http://wwfsassi.co.za/)

Slika 2. Područja rasprostranjenosti vrste *Mytilus galloprovincialis* u svijetu i Sredozemnom moru. (izvor: http://freegisdata.org/; Branch i Steffani, 2004)

Slika 3. Shematski prikaz anatomije dagnje Mytilus galloprovincialis.

Slika 4. Shematski prikaz lizosoma unutar stanice (○; Cooper Hausman, 2004).

Slika 5. Mjesta uzorkovanja dagnje *Mytilus galloprovincialis* u sjevernom Jadranu na postajama: Limski zaljev, Rovinj, Pula, Brestova, Rijeka i Bakar (•).

Slika 6. Shematski prikaz histokemijske metode po Moore-u za određivanje stabilnosti lizosomalnih membrana.

Slika 7. Obojane kriostatske sekcije probavne žlijezde koje pokazuju aktivnost N–acetil β-D heksozaminidaze u lizosomalnom vakuolnom sustavu probavnih stanica. Odjeljka 5. pokazuje maksimalni intenzitet bojanja, dok odjeljak 6. Pokazuje smanjenje intenziteta bojanja koja označava vjerojatni gubitak enzima difuzijom iz potpuno labiliziranih lizosoma (Martínez-Gómez, 2015).

Slika 8. Stanje eutrofikacije (izraženo preko TRIX-indeksa) na postajama sjevernog Jadrana istraženim tijekom 2005. godine za potrebe „Projekta Jadran“ (Kušpilić i Precali, 2010).

Slika 9. Stabilnost lizosomalnih membrana u dagnjama uzorkovanim na postajama Lim, Rovinj, Pula, Brestova, Rijeka i Bakar u sjevernom Jadranu tijekom srpnja 2016. godine.

Slika 10. Korelacija između stabilnosti lizosomalnih membrana (SLM) i stupnja eutrofikacije praćenog preko trofičkog indeksa (TRIX-indeks).

9 SAŽETAK

Stabilnost lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnji koristi se kao pokazatelj onečišćenja okoliša. U ovom radu je istražen učinak teških metala (kadmij, olovo i živa) i trofičkog indeksa na stabilnost lizosomalnih membrana u probavnoj žlijezdi dagnji *Mytilus galloprovincialis* uzorkovanih u kolovozu 2016. godine na postajama Limski kanal, Rovinj, Pula, Brestova, Rijeka i Bakar. Osim toga, u ovom radu istražen je i stupanj onečišćenja za svih šest postaja u sjevernom Jadranu, gdje postaje Pula, Rijeka i Bakar pokazuju najveće onečišćenje. Stabilnost lizosomalnih membrana određena je histokemijskom metodom po Moore-u, a podaci o koncentracijama metala u mekom tkivu školjkaša i trofički indeks istraženi su iz literature. Dagnje na svim postajama pokazuju stresne uvjete, ali najniže vrijednosti stabilnosti lizosomalnih membrana utvrđene su u dagnjama uzrokovanim na postajama Bakar i Lim. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da promjene ekoloških čimbenika ponekad mogu maskirati utjecaj onečišćenja, stoga je potrebno koristiti više parametara pri procjeni stanja morskog okoliša.

Ključne riječi: dagnja *Mytilus galloprovincialis*, stabilnost lizosomalnih membrana, teški metali, trofički indeks

10 ABSTRACT

Lysosomal membrane stability in mussel digestive gland is widely used biomarker that respond to pollutant exposure. In this paper, we studied the effect of heavy metals (cadmium, lead and mercury) and the trophic index on the lysosomal membrane stability in the digestive gland of mussels *Mytilus galloprovincialis.* Mussels were sampled in August 2016 at the stations Lim Channel, Rovinj, Pula, Brestov, Rijeka and Bakar, Northern Adriatic, Croatia. In addition, in this paper the pollution level for all six stations in the northern Adriatic was investigated. Stations, Pula, Rijeka and Bakar were showed the highest level of pollution. The lysosomal membrane stability was determined by the histochemical method by Moore, and metal concentration in mussel tissue and trofic index was investigated from the literature. Mussels sampled at all exhibit stressful conditions, but the lowest values of the lysosomal membrane stability are found in the mussels sampled at the Bakar and Lim. The results of this research showed that changes in ecological factors might mask the effects of pollution, and more parameters should be included in assessing the quality of the marine environment.

Key words: *Mytilus galloprovincialis* mussels, lysosomal membrane stability, heavy metals, trophic index